

Выбор баз данных
Параметры поиска
Формулировка запроса
Уточненный запрос
Найденные документы
Корзина
Сохраненные запросы
Статистика
Помощь
Предложения
Выход

Статус

- (11) Номер публикации  
 (13) Вид документа  
 (14) Дата публикации  
 (19) Страна публикации  
 (21) Регистрационный номер заявки  
 (22) Дата подачи заявки  
 (45) Опубликовано  
 (516) Номер редакции МПК  
 (51) Основной индекс МПК  
 Название  
 (71) Имя заявителя  
 (72) Имя изобретателя  
 (72) Имя изобретателя  
 (72) Имя изобретателя  
 (73) Имя патентообладателя

Реферат

по данным на 24.01.2007 - прекратил действие

2024021

C1

1994.11.30

RU

4934091/14

1991.05.05

1994.11.30

5

G01N33/52

METHOD OF TUBERCULOSIS DIAGNOSIS

Nauchno-issledovatel'skij institut khirurgii

Vostochno- Sibirskogo filiala SO RAMN

Majakova T.I.

Pljusnin S.A.

Kovaleva M.G.

Nauchno-issledovatel'skij institut khirurgii

Vostochno- Sibirskogo filiala SO RAMN

Реферат

ДОКУМЕНТ
в начало
в конец
печать
ТЕРМИНЫ
предыдущий
следующий

Выбор баз данных
Параметры поиска
Формулировка запроса
Уточненный запрос
Найденные документы
Корзина
Сохраненные запросы
Статистика
Помощь
Предложения
Выход

Библиография

## №2024021. Реферат

FIELD: medicine. SUBSTANCE: method involves sputum sample taking off, its autoclaving, extraction with chloroform-methanol mixture, evaporation, methylation, dissolving in hexene following by chromatomass-spectrometric assay of tuberculostearic acid. Method involves also separation of organic layer after extraction with chloroform-methanol mixture, its drying over anhydrous sodium sulfate and methylation at the methylating mixture boiling point for 15-20 min. EFFECT: simplified method, shortened time of assay.

Библиография

ДОКУМЕНТ  
в начало  
в конец  
печать

# ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

Выбор баз данных
Параметры поиска
Формулировка запроса
Уточненный запрос
Найденные документы
Корзина
Сохраненные запросы
Статистика
Помощь
Предложения
Выход

У Вас осталось  
462 запроса  
(0 у.е.)  
(4624 руб.)

## Статус

- (11) Номер публикации
- (13) Вид документа
- (14) Дата публикации
- (19) Страна публикации
- (21) Регистрационный номер заявки
- (22) Дата подачи заявки
- (45) Опубликовано
- (516) Номер редакции МПК
- (51) Основной индекс МПК
- Название
- (56) Аналоги изобретения
- (71) Имя заявителя
- (72) Имя изобретателя
- (72) Имя изобретателя
- (72) Имя изобретателя
- (73) Имя патентообладателя

## извещения к данному документу

по данным на 24.01.2007 - прекратил действие

2024021  
C1  
1994.11.30  
RU  
4934091/14  
1991.05.05  
1994.11.30  
5  
G01N33/52  
**СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ  
ТУБЕРКУЛЕЗА**  
Y. Clin. Ynvestig., 1979, V.63, N 5,  
P.813-819.  
Научно-исследовательский  
институт хирургии Восточно-  
Сибирского филиала СО РАМН  
Маякова Т.И.  
Плюснин С.А.  
Ковалева М.Г.  
Научно-исследовательский  
институт хирургии Восточно-  
Сибирского филиала СО РАМН

## ИЗВЕЩЕНИЯ К ПАТЕНТУ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

Код изменения правового статуса

**ММ4А - Досрочное прекращение  
действия патентов РФ из-за  
неуплаты в установленный срок  
пошлин за поддержание патента в  
силе**

Дата публикации бюллетеня

2000.09.27

Номер бюллетеня

27/2000

Выбор баз данных
Параметры поиска
Формулировка запроса
Уточненный запрос
Найденные документы
Корзина
Сохраненные запросы
Статистика
Помощь
Предложения
Выход

У Вас осталось  
462 запроса  
(0 у.е.)  
(4624 руб.)

## №2024021. Реферат

Использование: медицина, пульмонология. Цель - сокращение времени определения и упрощение способа. Сущность изобретения: забор пробы мокроты, ее автоклавирование, экстракция хлороформ-метанольной смесью, упаривание, метилирование, растворение в гексене и последующее хроматомасс-спектрометрическое определение туберкулостеариановой кислоты. Отличие способа заключается в отделении органического слоя после экстракции хлороформ-метанольной смесью, в высушивании его над безводным сульфатом натрия и проведение процесса метилирования при температуре кипения метилирующей смеси в течение 15 - 20 мин.

---

<b>Выбор баз данных</b>
<b>Параметры поиска</b>
<b>Формулировка запроса</b>
<b>Уточненный запрос</b>
<b>Найденные документы</b>
<b>Корзина</b>
<b>Сохраненные запросы</b>
<b>Статистика</b>
<b>Помощь</b>
<b>Предложения</b>
<b>Выход</b>

У Вас осталось  
462 запроса  
(0 у.е.)  
(4624 руб.)

### **№2024021. Описание**

Изобретение относится к медицине, а именно к бактериологии, и может быть использовано для идентификации микробактерий туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*).

Известны различные способы диагностики туберкулеза, включающие выявление микробактерий туберкулеза (МБТ) в патологическом материале.

Известен способ обнаружения МБТ путем прямой бактериоскопии (см. Перельман М. И. , Корякин В.А. и Протопопова И.М.

Туберкулез. М.: Медицина, с. 32-33). Для этого на обезжиренное стекло наносят каплю физиораствора и мокроту больного, которые тщательно растирают до однородности. Высушивают, фиксируют спиртом и красят фуксином Циля-Нильсена. Препарат микроскопируют. МБТ окрашиваются в красный цвет, а окружающий фон - в синий.

Также известен и бактериологический способ диагностики туберкулеза, включающий посев исследуемого материала на питательную среду Левенштейна-Йенсена. Культивирование проводят в течение 14-90 дней (см. Перельман М.И., Карякин В.А. и Протопопова И.М. Туберкулез. М.: Медицина, с. 32-33). Затем культуру пересевают на глицериновые среды, инкубируют с последующей обработкой кислотами и щелочами. В заключение

проводят пробу на устойчивость - мазки опускают в растворы: 1 - серной кислоты, 2 - едкого калия (натрия), 3 - жавелевой воды.

После чего мазки докрашивают и микроскопируют.

По наличию в микроскопической картине бесцветных продолговатых и морщинистых палочек микобактерий туберкулеза диагностируют туберкулез.

К недостаткам данных способов следует отнести низкую чувствительность методов и длительные сроки постановки диагноза, обусловленные культивированием бактерий.

Наиболее близкими по технической сущности к предлагаемому является способ диагностики туберкулеза путем обнаружения туберкулостеариновой кислоты, являющейся биомаркером микобактерий туберкулеза (J. Clin. Investig., v. 63, N 5, 1979, p. 813-819).

Известный способ осуществляют следующим образом.

2-4 мл мокроты больного обеззараживают автоклавированием (при 121°C в течение 60 мин при  $P = 1,1 \text{ кг/см}^2$ ), обрабатывают 5 мл 3%-ного водного раствора лаурилсульфата и 1%-ным раствором гидроксида натрия при перемешивании в течение 20 мин. Полученную смесь центрифугируют при 3 тыс. оборотов в мин в течение 30 мин, pH раствора доводят серной кислотой до 7,0 и лиофилизируют. Затем образцы переносят в 2-миллилитровую стеклянную ампулу и экстрагируют в течение ночи смесью хлороформ - метанол (2 : 1, V/V) при комнатной температуре. После центрифугирования в течение 20 мин при

4000 об/мин супернатант переносят в новую ампулу и концентрируют досуха в токе азота. После чего приливают 1 мл 3%-ного метанольного раствора хлористого водорода и ампулу запаивают. Метанолиз проходит при 80°C в течение 20 ч, по окончании ампулу центрифугируют при 4000 об/мин 20 мин. Супернатант упаривают досуха в токе азота и добавляют 100 мл н-гексана. Полученную смесь обрабатывают в ультразвуковой бане 1 мин при 125 В, затем раствор анализируют методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Условия ТСХ: пластины приготавливают нанесением слоя 0,25 мм силикагеля (Silicagel Go F 254, Merck A.G., Darmstadt, Germany). В качестве растворителя используют смесь н-гексана и диэтилового эфира (9 : 1). Через 30-40 мин пятно, соответствующее метиловому эфиру, соскабливают с пластины и экстрагируют этилацетатом. Перед инъекцией в газохроматографическую колонку образец был упарен досуха и растворен в гексане.

Образец снимали на приборе: масс-спектрометр (Varian Associates, Instrument Dis, Palo Alto, Calif, MaT model 112), соединенный с газовым хроматографом (Varian. Associates, model 112).

Условия хроматографирования следующие: стеклянная колонка, вн. диаметр 2 мм, заполненная 3,7% ОУ-17 на хромосорбе W, HP 80/100 меш, длина колонки - 3 м. Температура инжектора - 270°C, температура печи - 230°C. Газ-носитель - гелий, его скорость - 20 мл/мин. Условия работы масс-спектрометра следующие.

Температура сепаратора - 250°C, температура ионного источника - 230°C, энергия электронов 70 eV. Измерение проводили при детектировании по одному иону, соответственно по 312 m/z (молекулярный ион) и по 167 m/z. По наличию в полученном масс-спектре характерного молекулярного иона туберкулостеариновой кислоты диагностируют туберкулез. Общее время анализа составляет 4 сут. К недостаткам данного способа следует отнести длительность и многоэтапность операций, предшествующих хромато-масс-спектрометрическому исследованию пробы. Целью предлагаемого способа диагностики является сокращение времени определения и упрощение способа.

Поставленная цель достигается тем, что способ диагностики туберкулеза проводят путем забора пробы, ее автоклавирования, экстракции хлороформ-метанольной смесью, упаривания, метилирования, растворения в гексане и хромато-масс-спектрометрического определения туберкулостеариновой кислоты.

Сопоставительный анализ с прототипом показывает, что отличительными признаками заявляемого способа являются: отделение органического слоя после проведения экстракции, его высушивание над безводным сульфатом натрия и проведение метилирования при температуре кипения метилирующей смеси в течение 15-20 мин.

Эти отличия позволяют сделать вывод о соответствии заявляемого технического решения критерию изобретения



"новизна".

Сравнение заявляемого решения с другими техническими решениями показывает, что прием отделения органического слоя от водной фазы образца является широко используемым в органической химии, так же как и удаление следов воды из органического экстракта с помощью безводной соли  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Однако указанные приемы не использовались ранее для подготовки безводного образца к хромато-масс-спектрометрическому анализу. Введение данных приемов в заявленный способ позволило исключить технически сложный прием - лиофильную сушку биосубстрата и тем самым сократить общее время анализа на 4-6 ч.

Авторами заявляемого способа экспериментальным путем установлено, что в предлагаемом способе процесс метилирования происходит за 15-20 мин. Необходимым условием является проведение этой реакции при температуре кипения метилирующей смеси ( $t = 65-70^\circ\text{C}$ ) в колбе с обратным холодильником. Данный прием позволяет сократить время диагностики на сутки, поскольку в известном способе процесс метилирования идет в течение 20 ч (при  $t = 80^\circ\text{C}$ ).

Таким образом, авторами заявляемого способа диагностики установлено новое свойство анализируемой смеси - процесс метилирования происходит за 15-20 мин, что позволяет сделать вывод о соответствии технического решения критерию "существенные отличия".

Заявленный способ диагностики туберкулеза осуществляют следующим образом.

Для анализа забирают от 2 до 10 мг биосубстрата-мокроты, содержащего плевральную полость или дренажную жидкости.

Биосубстрат автоклавируют при температуре 121°C в течение 60 мин, к нему добавляют 5 мл гидроксида натрия (4%), встряхивают 10 мин, нейтрализуют разбавленной  $H_2SO_4$  до pH 7,0 и заливают экстрагирующей смесью - хлороформ : метанол, взятых в соотношении 2 : 1. Соотношение биосубстрата и экстрагента составляет 1 : 1. Экстракцию проводят при комнатной температуре в течение 20 ч. Затем смесь центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин, отделяют нижний органический слой, который высушивают над  $Na_2SO_4$ (безводным). После чего экстракт отфильтровывают от  $Na_2SO_4$  и упаривают досуха в токе азота.

Остаток метилируют в 3%-ном растворе HCl в метаноле при температуре кипения 65-70°C в течение 15-20 мин. Затем раствор упаривают в токе азота, остаток растворяют в 10 мл гексана и анализируют на хромато-масс-спектрометре (ХМС) методом селективного ионного детектирования (SIM) при  $m/z$  312 и записи полного масс-спектра метилата  $C_{19}$  кислоты. Основные фрагментарные ионы масс-спектра туберкулостеариновой (TbS) кислоты: ( $m/z$ ) 312, 269, 199, 171, 167, 149, 141, 113.

ХМС-анализ выполняют на приборе хромато-масс-спектрометре фирмы LKB 20-91 с ЭВМ РДП1134. Условия хроматографирования: стеклянная капиллярная колонка ( $l = 25$ ) с

неподвижной жидкой фазой SE-30; температура инжектора - 350°C; температура термостата - 140 -> 320°C, 4'/мин; газ-носитель - He,  $V_{\text{He}}$  - 20 мл/мин.

Условия снятия масс-спектра: температура сепаратора - 320°C; температура ионного источника - 320°C; энергия ионизирующих электронов - 70 eV. Ионный ток записывали по одному иону - m/z 312, т.е. в режиме селективного ионного детектирования.

Минимальная определяемая концентрация TbS кислоты в образце составляла 100 мг/мл. Общее время анализа занимало 2 сут.

Пример 1. Взята на исследование мокрота от больного Г., поступившего в гнойное отделение центра хирургической инфекции с предварительным диагнозом - гангрена легкого (N истории болезни 5850, дата взятия анализа 20.12.90). 10 мл мокроты автоклавировали при 121°C 30 мин,  $P = 1,1 \text{ кР/см}^2$ . К обеззараженному биосубстрату добавили 5 мл 4%-ного раствора NaOH, содержимое встряхивали в течение 10 мин, затем нейтрализовали разбавленной  $\text{H}_2\text{SO}_4$  до pH 7,0 и заливали экстрагентом хлороформ-метанол (2 : 1) в количестве 15 мл и оставляли на ночь при комнатной температуре. После центрифугирования отделяли нижний органический слой и высушивали его над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  в течение 20 мин. Отфильтровывали экстракт от  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали досуха в токе азота. Сухой остаток метилировали 3%-ным раствором соляной кислоты в метаноле, приготовленном добавлением 5 мл

хлористого ацетила к 100 мл сухого MeOH. Метилирование проводили десятью мл метилирующего агента при нагревании до температуры кипения (с обратным холодильником) в течение 15 мин. Метилированный продукт упаривали в токе азота досуха, остаток растворяли в 100 мкл гексана и анализировали на хромато-масс-спектрометре фирмы ИКВ 2091 с ЭВМ РДП-1134 с использованием стеклянной капиллярной колонки  $l = 25$  м с неподвижной жидкой фазой SE-30. Хроматографирование проводили при температуре 140-320°C, 4°/мин; газ-носитель He; температура инжектора - 350°C; температура ионного источника - 320°C; температура сепаратора - 320°C; энергия ионизирующих электронов - 70 eV. Запись масс-спектра TBS кислоты вели при максимальной интенсивности 1357. В результате проведенного анализа установлено присутствие туберкулостеариновой кислоты в образце.

П р и м е р 2. Проведен забор мокроты от больного С. с предварительным диагнозом двухсторонняя абсцедирующая пневмония (N истории болезни 1899). 10 мл мокроты автоклавировали (121°C, 30 мин,  $P = 1,1$  кг/см<sup>2</sup>) с добавлением к ней 5 мл 4%-ного водного раствора NaOH, содержимое встряхивали 10 мин, раствор нейтрализовали разбавленной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до pH 7,0 и заливали экстрагентом хлороформ-метанол (2 : 1, V/V) в количестве 15 мл и оставляли на ночь при комнатной температуре. После центрифугирования отделяли нижний органический слой и высушивали его над 15 г безводной NaSO<sub>4</sub> в

течение 20 мин. Экстракт отфильтровывали и упаривали досуха в токе азота. Сухой остаток метилировали 3%-ным раствором HCl в метаноле. Метилирование проводили 10 мл метилирующего агента при нагревании до температуры кипения (с обратным холодильником) в течение 20 мин. Прометилированный продукт упаривали в токе азота досуха, остаток растворяли в 100 мкл гексана и анализировали на хромато-масс-спектрометре (условия ХМС-анализа приведены выше). Запись масс-спектра в интервале выхода TbS кислоты проводили при интенсивности 2857. Туберкулостеариновой кислоты не обнаружено.

Из представленных материалов следует, что заявленный способ позволяет в 2 раза сократить общее время проведения анализа (2 сут вместе 4 по способу-прототипу) и значительно упростить его за счет исключения приемов лиофилизации. Для наглядного выявления различий сравниваемых технических решений приведен их сопоставительный анализ:

Известный способ 1. Взятие биопробы (мокрота) 2.

Автоклавирование пробы при 121°C в течение 60 мин 3.

Обработка 3%-ным водным раствором лаурилсульфата и 1% - ным водным раствором гидроксида натрия при перемешивании в течение 20 мин 4. Центрифугирование при 3 тыс. об. в мин в течение 30 мин. 5. Доведение pH до 7,0 (с использованием серной кислоты) 6. Лиофилизация 7. Экстракция смесью хлороформ - метанол (1 : 1) в течение 20 ч 8. Центрифугирование

при 4 тыс. об. в мин в течение 20 мин 9. Концентрация в токе азота (досуха) 10. Добавление 1 мл 3%-ного метанольного раствора кислоты 11. Метанолиз при 80°C в течение 20 ч 12. Центрифугирование при 4 тыс. об. в мин в течение 20 мин 13. Упаривание супернатанта в токе азота 14. Добавление 100 мл н-гексана 15. Обработка смеси в ультразвуковой бане в течение 1 мин при 125 В 16. Анализ методом тонкослойной хроматографии на силикагеле, элюент н-гексан - диэтиловый эфир (9 : 1) 17. Соскабливание пятна через 30-40 мин, соответствующего метиловому эфиру и экстрагирования его этилацетатом 18. Упаривание досуха 19. Растворение в гексане 20. Анализ на хромато-масс-спектрометре 21. Условия хроматографирования: стеклянная колонка,  $l = 3$  м, внутренний  $d = 2$  мм, заполненная 3,7% ОУ-17 на хромосорбе WHP 80/100 меш,

$t$  инжектора = 270°C.

$t$  термостата = 230°C,

газ-носитель - гелий,

$V_{\text{He}} = 20$  мл/мин 22. Условия работы масс-спектрометра:

$t$  сепаратора = 250°C,

$t$  ионного источника = 230°C,

$E = 70$  эВ, измерение проводили при селективном детектировании по ионам  $m/z$  312 и 167.

Общее время анализа - 4 сут

Заявляемый способ 1. + 2. + 3. Обработка 4%-ным водным раствором гидроксида натрия, встряхивание в течение 10 мин 4. - 5. + 6. - 7. +, соотношение растворителей 2 : 1, соотношение экстракта и экстрагента 1 : 1, + 8. +, при 3 тыс. об. в мин в течение 15 мин, отделение нижнего органического слоя, его высушивание над безводным сульфатом натрия, фильтрование 9. + 10. + 11. +, при 65-70°C в течение 15-20 мин 12. - 13. + 14. +, 10 мл н-гексана 15. - 16. - 17. - 18. - 19. - 20. + 21. Условия хроматографирования: стеклянная капиллярная колонка,  $l = 25$  м, заполненная 5% SE-30 на хромосорбе,

$t$  инжектора 350°C,

$t$  термостата 140-320°C, 4°/мин,

газ-носитель - гелий,

$V_{He} = 20$  мл/мин 22. Условия работы масс-спектрометра:

$t$  сепаратора = 320°C,

$t$  ионного источника = 320°C

$E = 70$  эВ, измерение проводили при селективном ионном детектировании по иону  $m/z$  312.

Общее время анализа - 2 сут

Основными отличительными приемами заявленного способа/обеспечивающими движение поставленной цели/ являются высушивание органического слоя над безводным сульфатом натрия и проведение процесса метилирования в течение 15-20 мин при 65-70°C.

---



<b>Выбор баз данных</b>
<b>Параметры поиска</b>
<b>Формулировка запроса</b>
<b>Уточненный запрос</b>
<b>Найденные документы</b>
<b>Корзина</b>
<b>Сохраненные запросы</b>
<b>Статистика</b>
<b>Помощь</b>
<b>Предложения</b>
<b>Выход</b>

У Вас осталось  
462 запроса  
(0 у.е.)  
(4624 руб.)

### №2024021. Формула

**СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА**, включающий взятие пробы мокроты, автоклавирование пробы при 121°C в течение 60 мин при давлении 1,1 кг/см<sup>2</sup>, экстракцию хлороформ-метанольной смесью, взятой в соотношении 2 : 1, центрифугирование, упаривание супернатанта в токе азота, добавление к высушенному супернатанту 3%-ного метанольного раствора хлористого водорода и инкубацию полученной смеси при 80°C, повторное центрифугирование и упаривание супернатанта, растворение последнего в гексане с последующим определением туберкулостеариновой кислоты хроматографическим и масс-спектрометрическим методами, отличающийся тем, что, с целью ускорения и упрощения способа, органический слой отделяют после центрифугирования и перед упариванием его высушивают над безводным сульфатом натрия, а инкубацию проводят при 65 - 70°C в течение 15 - 20 мин.

---